昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, May 2012, 55(5): 499 – 509 ISSN 0454-6296

甜菜夜蛾触角结合蛋白Ⅱ的 cDNA 克隆、组织分布及配体结合特性分析

张 婷, 刘乃勇, 董双林*

(南京农业大学植物保护学院, 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095)

摘要: 触角结合蛋白(antennal binding proteins, ABPs)是气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)的一个亚类, 推测其在昆虫嗅觉中起作用。为了探讨这一问题, 本研究通过转录组数据分析并利用 RACE 技术, 克隆了甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 触角结合蛋白Ⅱ基因(*SexigABP2*)的全长 cDNA 序列(GenBank 登录号为 HQ234486)。序列分析表明, 该基因开放阅读框长 444 bp, 编码 148 个氨基酸, 具有 OBPs 典型的 6 个半胱氨酸位点; 其氨基酸序列和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 HvirABP2 的一致性最高, 达 72%。实时定量 PCR 分析显示, 该基因主要在触角中表达, 在喙、足、翅等组织中也有少量表达, 且在雌蛾触角及足中的表达量显著高于雄蛾。进一步对该基因进行原核表达和纯化, 利用荧光竞争结合实验测定了 SexigABP2 对 35 种气味物质的结合能力, 发现其对甜菜夜蛾性信息素组分(*Z*)-9-十四碳烯醇和植物挥发物法尼醇的结合能力较强, 结合常数分别为 8.24 μmol/L 和 8.14 μmol/L。结合能力比较表明, SexigABP2 对不饱和长碳链化合物较饱和短碳链化合物具有更强的结合能力; 在不饱和长碳链化合物中, 对醇类物质又较乙酸酯类物质具有更强的结合能力。结果提示 *SexigABP2* 可能参与了成虫对不饱和长碳链的植物挥发物的感受。

关键词: 甜菜夜蛾; 触角结合蛋白; 基因克隆; 组织表达谱; 配体结合; 荧光竞争结合实验

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2012)05-0499-11

cDNA cloning, tissue distribution and ligand binding characteristics of antennal binding protein 2 from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHANG Ting, LIU Nai-Yong, DONG Shuang-Lin* (Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests of Ministry of Education, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Antennal binding proteins (ABPs) represent a sub-class of odorant binding proteins (OBPs), and thus are assumed to play a role in insect olfaction. In order to explore the role of ABPs in olfaction, the full-length cDNA of an antennal binding protein 2 gene from *Spodoptera exigua* (*SexigABP2*) (GenBank accession no. HQ234486) was identified by transcriptome analysis and RACE technology. The sequence analysis showed that *SexigABP2* contains a 444 bp open reading frame that encodes 148 amino acids including the six conserved cysteine residues of typical OBPs. SexigABP2 shares the highest amino acid identity (up to 72%) with an ABP2 from *Heliothis virescens* (HvirABP2). The results of real-time quantitative PCR showed that *SexigABP2* was highly expressed in male and female antennae, but weakly expressed in proboscis, legs, and wings of both sexes. The expression levels in female antennae and legs were significantly higher than those in male antennae and legs, respectively. *SexigABP2* was further expressed in a prokaryotic expression system, and the protein was purified. By fluorescence competitive binding assay, the affinities of SexigABP2 with 35 odorant compounds were tested. Among the tested ligands, (*Z*)-9-tetradecenol (a sex pheromone component of *S. exigua*) and farnesol (a plant volatile compound) showed the highest affinity, with the Ki values of 8.24 μmol/L and 8.14 μmol/L, respectively. Affinity comparison indicated that long carbon-chain compounds with unsaturated bond(s) exhibited the higher affinities than short ones without unsaturated bond; among the unsaturated long

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071978)

作者简介: 张婷, 女, 1986 年 12 月生, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化, E-mail: zhangting12686@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sldong@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2012-01-16; 接受日期 Accepted: 2012-03-29

carbon-chain compounds, however, alcohols displayed higher affinities than acetates. The results suggest that *SexigABP*2 might be involved in perception of plant volatile compounds with a long carbon-chain and unsaturated bonds.

Key words: *Spodoptera exigua*; antennal binding protein; gene cloning; tissue expression pattern; ligand binding; fluorescence competitive binding assay

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner) 属鳞翅目夜蛾科，是一种世界性分布的多食性害虫。在我国自20 世纪 80 年代中后期以来，其发生和危害逐年加重，在南方已成为常发性害虫，在北方间歇性成灾(修伟明等，2005)。目前，甜菜夜蛾的防治主要采用化学防治，但高度的抗药性(夏晓明等，2003)致使防治效果较差，加之蔬菜害虫防治对杀虫剂残留及毒性的特殊要求，发展更为高效和环保的防治策略尤为必要。嗅觉在昆虫寻找配偶、食物及产卵场所等活动中起重要作用，基于嗅觉调控的性信息素及取食和产卵引诱剂已在很多害虫防治中得到应用(Burkett-Cadena and Mullen, 2007; Cilek *et al.*, 2011; Hoddle *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011b)，但要更好地开发和利用这类防治方法，需要深入研究昆虫的嗅觉机制。

气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)是一类高浓度存在于昆虫触角感器液中的水溶性小分子蛋白，其典型特征是具有 6 个保守的半胱氨酸位点。OBP 的功能是与进入感器腔内的疏水性气味分子结合，并运载其穿过淋巴液，到达嗅觉神经树突膜表面的受体部位，激活受体，由此启动级联反应，使化学信号转变为电信号(Vogt and Riddiford, 1981; Pelosi, 1998; Vogt *et al.*, 1999)。在鳞翅目昆虫中，OBPs 可进一步分为性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)(Vogt and Riddiford, 1981)、普通气味结合蛋白(general odorant binding proteins, GOBPs)(Vogt *et al.*, 1991)和触角结合蛋白(antennal binding proteins, ABPs)(Krieger *et al.*, 1996) 3 个亚类。ABPs 最先由 Krieger 等(1996)在家蚕 *Bombyx mori* 触角中发现，该蛋白在触角中特异表达，具有气味结合蛋白的典型特征，但与 PBPs 和 GOBPs 的同源性较低，且在亲水和疏水区域的分布上也有区别。随后，人们在烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 等多种鳞翅目昆虫中克隆到了 ABP 基因(Vogel *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011c)。根据组织分布和结构特征，推测 ABPs 可能在嗅觉中扮演角色，但相关功能研究甚少。

本研究通过对甜菜夜蛾触角转录组数据分析并结合 RACE 技术，克隆了一个新的 ABP 基因(*SexigABP*2)，并在体外表达和纯化得到大量蛋白的基础上，测定了该蛋白与不同结构气味物质的结合能力，以期为探讨 ABPs 的生理功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

甜菜夜蛾幼虫为室内人工饲料饲养，饲料配方参见黄春霞等(2002)。蛹期分雌雄，羽化后喂以 5% 的蜂蜜水。养虫室温度为 26℃，相对湿度为 70%~80%，光周期 14L:10D。

1.2 主要试剂和仪器

SV Total RNA Isolation System (Promega, USA)、SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒、荧光定量试剂盒 SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Prefect Real Time)、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 和常规试剂购自 TaKaRa 公司，*pEASY*™-T3 克隆载体、*Trans*1-T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司，限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 购自 Fermentas 公司，肠激酶购自南京金斯瑞生物科技有限公司，所用引物由上海生工生物技术有限公司合成。荧光竞争结合实验中所用信息素组分由中国科学院上海生理生态研究所昆虫化学生态室惠赠，荧光探针 N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)和植物挥发性化合物均购自 Sigma-Aldrich 公司，纯度≥95%。

凝胶层析柱 XK16/20 购自瑞典 GE Healthcare (Amersham)公司，ABI 7500 实时定量 PCR 仪由美国应用生物系统公司生产，多功能酶标仪 SpectraMax M5 由美国 Molecular Devices(MD)公司生产。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

为测定触角结合蛋白基因的组织表达谱，收取 3 日龄雌雄成虫的不同组织(触角、喙、头、胸、腹、足和翅)。其中，触角收取 100 对，喙 100 根，其他组织适量，重复 3 次。按照说明书，用 SV Total RNA Isolation System 提取总 RNA，然后用 M-MLV

反转录酶合成 cDNA 第一链，-20℃保存备用。

1.4　RACE 扩增

根据本实验室测得的甜菜夜蛾转录组数据，应用生物信息学方法得到 *SexigABP*2 基因的 cDNA 片段。根据片段序列，设计合成 5′ GSP 和 3′ GSP 引物(表 1)。依据 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒操作说明，进行 RACE cDNA 第一链的合成及 PCR 扩增。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，目标条带经 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences, USA) 回收后，连接到 *pEASY*™-T3 载体上，然后转化到 *Trans*1-T1 感受态细胞中。转化后的菌落经蓝白斑筛选，挑取单个白色菌落放入含有 0.1% Amp 的 LB 培养液中，在 250 r/min、37℃下震荡培养 12~16 h 后，采用 E. Z. N. A.™质粒提取试剂盒(Omega，USA)提取质粒，送南京金斯瑞生物技术有限公司测序。

表 1　本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	目的 Purpose
5′ GSP	CGTTCGCCAAGGAGCATTTGAGCA	5′和 3′ 端扩增 5′ and 3′ cDNA end cloning
3′ GSP	GACGTTGACAGCACTATGGCGTTCG	
SexigABP2-1	F：TTGACAGCACTATGGCGTTC	表达水平分析 Expression analysis
SexigABP2-2	R：GCAATTTGGCTCTATCACACC	
SexigGAPDH-1	F：CAACCACTCATCTATCTTCG	
SexigGAPDH-2	R：CATTTATCTCTACAACGCAATC	
SexigABP2-3	F：C<u>GGATCC</u>ATGTCTGGTGATGAAGAAGCAGGTGT	原核表达 Prokaryotic expression
SexigABP2-4	R：G<u>CTCGAG</u>TCAGTCCATCTTCTTTTTAGTTTCGGC	

引物序列下划线部分为酶切位点。The restriction site is underlined in the primer sequence.

1.5　序列分析

利用 SignalP 4.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 进行信号肽预测，应用 GeneDoc 软件进行序列比对，应用 MEGA 5.0 软件并采用邻近法(1 000 次抽样分析)进行系统进化分析。

1.6　Real-time qPCR 测定

为了明确 *SexigABP*2 基因的组织表达谱，利用 ABI 7500 Real-Time PCR System 进行了相对表达量测定。内参基因为 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因(GenBank 登录号：JF728815)，用于实时荧光定量 PCR 的引物序列见表 1。RT-qPCR 反应体系为：SYBR® *Premix Ex Taq*™ (2×)：10 μL；PCR Forward Primer (10 μmol/L)：0.4 μL；PCR Reverse Primer (10 μmol/L)：0.4 μL；ROX Reference Dye Ⅱ(50×)：0.4 μL；cDNA 模板：2.0 μL；超纯水补足至 20 μL。采用两步法标准程序进行扩增：95℃预变性 30 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，共 40 个循环。反应后进行溶解曲线分析，以排除非特异性 PCR 产物的污染，空白对照模板以超纯水代替 cDNA。

1.7　蛋白的原核表达与纯化

根据 *SexigABP*2 阅读框序列及表达载体 pET-30a(+)设计带有 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ酶切位点(以下划线标示)的引物序列(表 1)。以成虫触角 cDNA 为模板，采用高保真性和高扩增效率的 DNA 聚合酶 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase，按照 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 说明书进行 PCR 扩增。将 PCR 产物回收，再连接到 *pEASY*™-T3 载体中并转化到 *Trans*1-T1 感受态细胞中，提取质粒 DNA 并测序验证。将含有目的片段的重组质粒 DNA 和 pET-30a(+)质粒 DNA 分别进行双酶切(*Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ)，然后将目的片段连接到 pET-30a(+)载体，再转化到 *Trans*1-T1 感受态细胞中。用含抗生素卡那霉素的 LB 平板进行筛选，挑取阳性克隆，小量提取质粒进行测序。经测序验证后的质粒转入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)感受态细胞中，涂板培养后挑取单菌落接种于 5 mL LB 培养液(含 Kan 50 μg/mL)中，37℃振荡培养过夜。次日，将所得菌液按 1/100 的比例接种于新鲜的 LB 培养液(含 Kan 50 μg/mL)中，37℃振荡培养，当细胞生长至 OD_{600} =0.6 时，加入 IPTG(终浓度为

0.2 mmol/L)，37℃下 250 r/min 振荡培养 5 h。将菌液 8 000 ×g 离心 20 min 后收集沉淀(菌体)，加入预冷的 Resuspension buffer (20 mmol/L Tris-HCl，0.5 mmol/L NaCl，pH 7.4)将沉淀重新悬浮，超声破碎后用 12 000 ×g 离心 15 min，分别收集上清及沉淀，用 SDS-PAGE 检测重组蛋白是否为可溶性蛋白。重组蛋白的纯化使用装有 Ni Sepharose™ High Performance 填料的亲和层析柱 XK16/20，对纯化后的重组蛋白进行肠激酶酶切以切除 His-tag，酶切后的重组蛋白再次过亲和层析柱。纯化后的目的蛋白经过透析(除盐)、冷冻干燥后，保存于 -70℃ 备用。

1.8 荧光竞争结合实验

将冻干的蛋白 SexigABP2 溶于 20 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.4)缓冲液中，配成蛋白溶液，测定浓度。荧光探针 1-NPN 和气味物质(性信息素组分和植物挥发性化合物，见表 2)溶于甲醇中，使其终浓度为 1 mmol/L，作为工作液。

表 2 荧光竞争结合实验中所用配体

Table 2 The ligands used in the fluorescence competitive binding experiments

配体编号 Ligand no.	化合物 Ligand name	CAS 登记号 CAS number
1	(*Z*)-11-十六碳烯乙酸酯 (*Z*)-11-Hexadecenyl acetate	34010-21-4
2	(*Z*)-9-十六碳烯乙酸酯 (*Z*)-9-Hexadecenyl acetate	34010-20-3
3	(*Z*, *E*)-9, 11-十四碳二烯乙酸酯 (*Z*, *E*)-9, 11-Tetradecadienyl acetate	50767-79-8
4	(*Z*)-11-十四碳烯乙酸酯 (*Z*)-11-Tetradecenyl acetate	20711-10-8
5	(*Z*)-9-十四碳烯乙酸酯 (*Z*)-9-Tetradecenyl acetate	16725-53-4
6	(*E*)-9-十四碳烯乙酸酯 (*E*)-9-Tetradecenyl acetate	16725-53-4
7	(*Z*)-7-十四碳烯乙酸酯 (*Z*)-7-Tetradecenyl acetate	16974-10-0
8	(*Z*, *E*)-9, 12-十四碳二烯乙酸酯 (*Z*, *E*)-9, 12-Tetradecadienyl acetate	31654-77-0
9	(*Z*)-13-十八碳烯醛 (*Z*)-13-Octadecenal	58594-45-9
10	(*Z*)-9-十六碳烯醛 (*Z*)-9-Hexadecenal	56219-04-6
11	(*E*)-11-十六碳烯醇 (*E*)-11-Hexadecenol	61301-56-2
12	(*Z*)-9-十六碳烯醇 (*Z*)-9-Hexadecenol	10378-01-5
13	(*Z*)-11-十六碳烯醇 (*Z*)-11-Hexadecenol	56683-54-6
14	(*Z*)-9-十四碳烯醇 (*Z*)-9-Tetradecenol	35153-15-2
15	乙酸丁酯 Butyl acetate	123-86-4
16	乙酸己酯 Hexyl acetate	142-92-7
17	乙酸庚酯 Heptyl acetate	112-06-1
18	乙酸正戊酯 Amyl acetate	628-63-7
19	乙酸辛酯 Octyl acetate	112-14-1
20	乙酸壬酯 Nonyl acetate	143-13-5
21	(*E*)-2-己烯醛 (*E*)-2-Hexenal	6728-26-3
22	(*Z*)-3-乙酸己烯酯 (*Z*)-3-Hexenyl acetate	1708-82-3
23	(+)-α-蒎烯 (+)-α-Pinene	7785-70-8
24	(*R*)-(+)-柠檬烯 (*R*)-(+)-Limonene	138-86-3
25	1-己醇 1-Hexanol	111-27-3
26	芳樟醇 Linalool	78-70-6
27	香叶醇 Geraniol	106-24-1
28	橙花叔醇 Nerolidol	7212-44-4
29	法尼醇 Farnesol	4602-84-0
30	苯乙醇 Phenethyl alcohol	60-12-8
31	正十七烷 Heptadecane	629-78-7
32	苯甲醛 Benzaldehyde	100-52-7
33	正十四烷 Tetradecane	629-59-4
34	正十二烷 Dodecane	112-40-3
35	苯乙酮 Acetophenone	98-86-2

以 1-NPN 为探针，利用荧光竞争结合实验测定气味物质和 OBP 间的亲和力已有很多报道(Zhou *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2011; 孙红岩等, 2011)。首先测定 SexigABP2 与 1-NPN 的结合曲线。将蛋白溶液加入 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中，使其终浓度为 2 μmol/L，按 2，4，6，8，10，12，16 和 20 μmol/L 的浓度梯度加入 1-NPN，每次加入后反应 2 min，在 337 nm 激发，记录荧光发射情况，利用其荧光值计算出该蛋白与 1-NPN 的结合常数，然后利用竞争结合实验测定气味物质和蛋白的结合能力。在竞争结合实验中，蛋白和 1-NPN 的浓度均为 2 μmol/L，反应时间为 2 min，在 337 nm 激发，记录荧光值(初始荧光值)。然后将被测气味物质按终浓度 2，4，6，8，10，12，16 和 20 μmol/L 的浓度梯度加入到 1-NPN 和蛋白的混合液中，每次加入后反应 2 min，记录荧光值。对于浓度在 20 μmol/L 时相对荧光值降到 60% 以下的气味物质，再进行 2 次重复试验，以 3 次重复计算有关参数；对于结合能力较低的气味物质，第一次测定后不再进行重复试验。计算荧光值降低到初始荧光值一半时气味物质的浓度，即 IC_{50} 值，利用公式 $Ki = IC_{50}/(1 + [1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$ 计算各气味物质的结合常数，其中[1-NPN]为未结合的 1-NPN 浓度，$K_{1\text{-NPN}}$ 为 1-NPN 与 SexigABP2 的结合常数(Ban *et al.*, 2003)。

1.9　数据统计与分析

在 Real-time qPCR 测定中，用 Q-Gene 软件进行表达量的计算(Muller *et al.*, 2002; Simon, 2003)，用 SAS 9.0 进行数据统计分析，采用 *t* 检验比较 *SexigABP2* 在雌雄虫同一组织的表达量是否差异显著。

2　结果与分析

2.1　甜菜夜蛾 ABP2 基因的全长 cDNA 克隆及序列分析

对转录组数据分析得到甜菜夜蛾触角结合蛋白基因的 cDNA 片段，然后设计特异性引物并通过 RACE 技术，获得 cDNA 全长序列。该基因命名为 *SexigABP2*，在 GenBank 的登录号为 HQ234486。其 cDNA 序列全长 594 bp，其中开放阅读框 444 bp，编码 148 个氨基酸，N 端前 21 个氨基酸为预测的信号肽(图 1)。SexigABP2 的预测分子量为 16.32 kDa，等电点为 4.42。

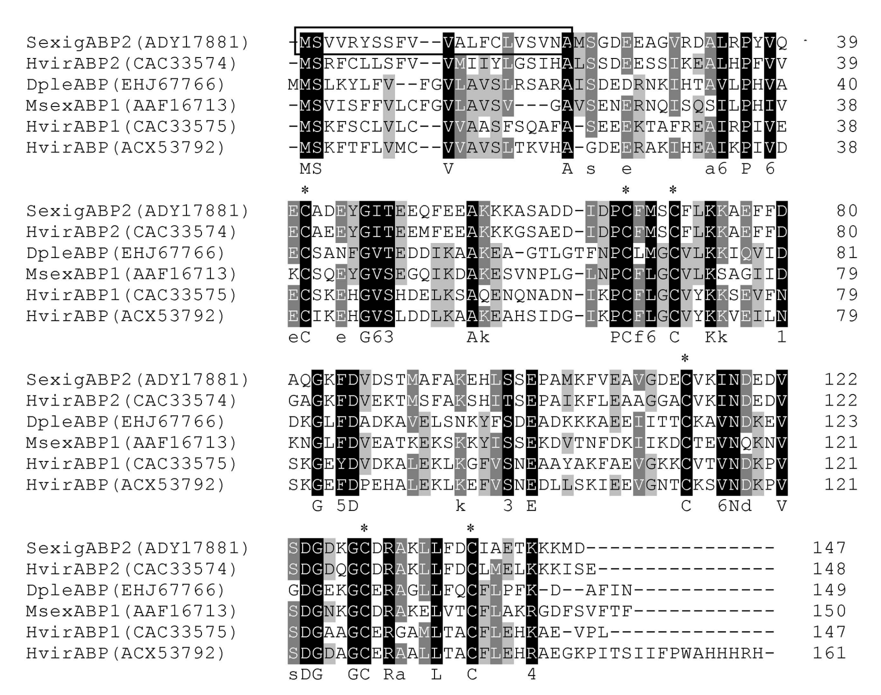


图 1　SexigABP2 与其他鳞翅目昆虫 ABPs 的氨基酸序列比对

Fig. 1　Alignment of deduced amino acid sequences of *SexigABP2* with those of other Lepidopteran species

昆虫及其 ABP (Insects and their ABPs)：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, SexigABP2；烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, HvirABP1, HvirABP2, HvirABP；黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*, DpleABP；烟草天蛾 *Manduca sexta*, MsexABP1. 图中左边为 ABP 名称及其序列登录号(括号内)。方框内序列为 SexigABP2 预测的信号肽序列；相同和相似的氨基酸分别用黑色和灰色标出；星号代表 ABPs 中保守的半胱氨酸位点。The names and the GenBank accession numbers (in the brackets) of the ABPs are listed on the left of sequences. Predicted signal peptides of SexigABP2 are boxed; the identical and similar amino acids are highlighted in dark and grey, respectively; and the asterisks represent the positions of the conserved cysteine residues in ABPs.

2.2　SexigABP2 氨基酸序列的比对及系统进化分析

与其他鳞翅目昆虫 ABPs 的氨基酸序列比对结果表明(图 1)，SexigABP2 也具有 6 个保守的半胱氨酸位点。SexigABP2 和 HvirABP2 的氨基酸序列一致性最高，为 72%，揭示这两种昆虫在进化关系上较近。这与系统进化分析的结果相一致，在系统进化树中 SexigABP2 和 HvirABP2 也聚在一起(图 2)。将 SexigABP2 与 8 种鳞翅目昆虫的 25 个 ABPs 构建系统进化树，结果显示(图 2)，26 个 ABPs 被分成 3 个大的分支。其中 ABP1，ABP2 和 ABP5 处在一个大的分支上；ABP3 和 ABPX 位于另一个分支；而 ABP4，ABP6，ABP7 和 ABP8 处在一个大的分支上，这在一定程度上反映了 SexigABP2 在几种鳞翅目昆虫中的遗传关系。

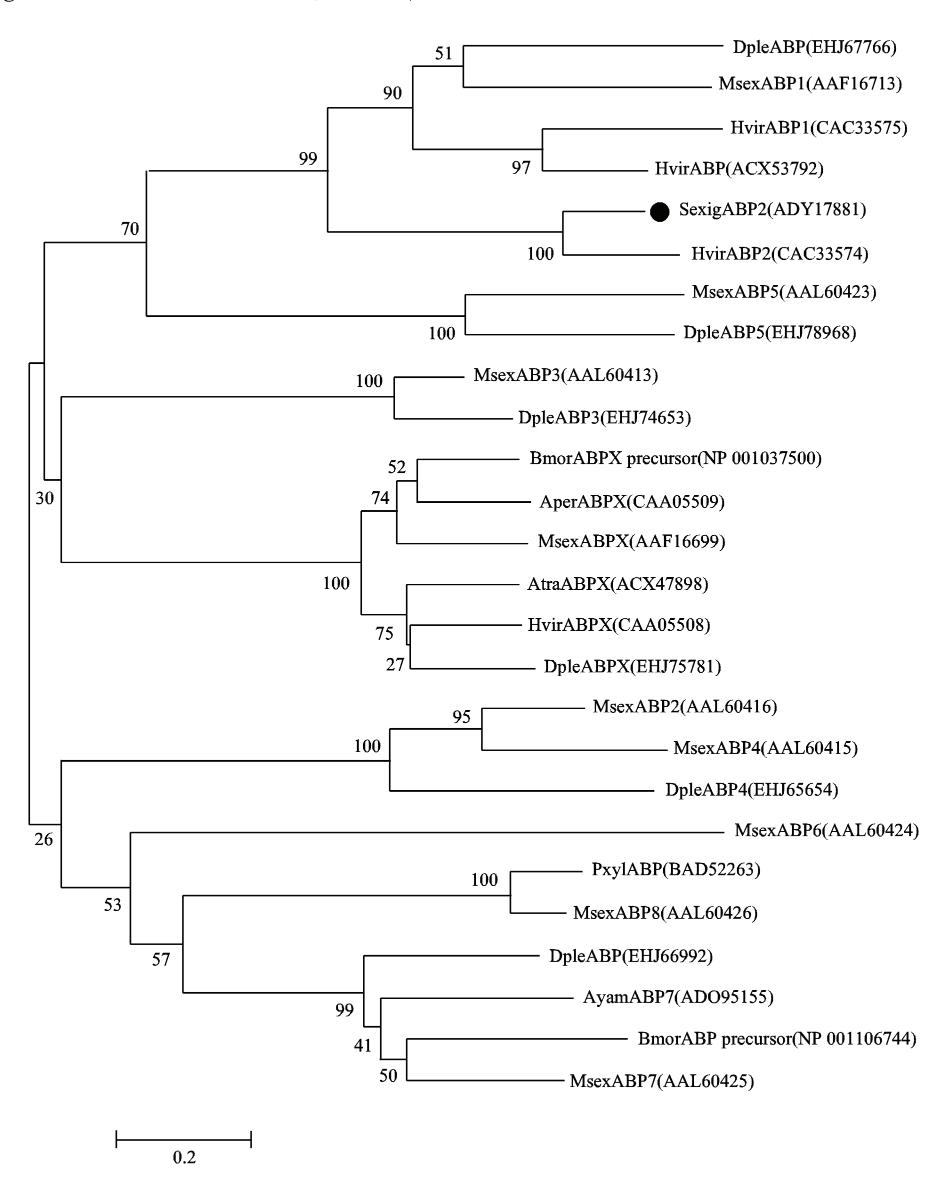


图 2　鳞翅目昆虫 ABPs 的系统发育分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis based on amino acid sequences of lepidopteran ABPs

昆虫及其 ABPs (Insects and their ABPs)：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*，SexigABP2；黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*，DpleABP3，DpleABP4，DpleABP5，DpleABPX，DpleABP；烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*，HvirABP1，HvirABP2，HvirABP，HvirABPX；小菜蛾 *Plutella xylostella*，PxylABP；家蚕 *Bombyx mori*，BmorABPX precursor；柞蚕 *Antheraea pernyi*，AperABPX；烟草天蛾 *Manduca sexta*，MsexABP1，MsexABP2，MsexABP3，MsexABP4，MsexABP5，MsexABP6，MsexABP7，MsexABP8，MsexABPX；半目大蚕蛾 *Antheraea yamamai*，AyamABP7；脐橙螟 *Amyelois transitella*，AtraABPX. 图中 ABP 名称后的括号内是 ABP 的序列登录号。The GenBank accession numbers are placed in the brackets after the ABP names in the figure. 标尺示遗传距离。The scale bar represents the genetic distance.

2.3 *SexigABP2* 基因的组织表达谱

为了探索其功能，利用 RT-qPCR 技术检测了 *SexigABP2* 基因在雌雄虫不同组织的转录水平(图3)。结果表明，*SexigABP2* 基因主要在触角中表达，但在喙、足和翅也有少量表达，在头、胸、腹中基本没有表达。和雄虫相比，*SexigABP2* 基因在雌虫触角和足中的表达量显著较高($P<0.05$)。

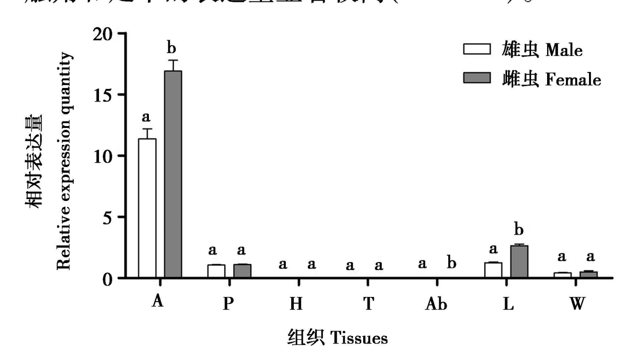


图3　实时定量 PCR 检测 *SexigABP2* 在不同组织和性别间的表达水平

Fig. 3　Expression levels of *SexigABP2* in different tissues and gender measured by Real-time qPCR

A：触角 Antenna；P：喙 Proboscis；H：头(去除了触角和喙) Head (antenna and proboscis removed)；T：胸 Thorax；Ab：腹 Abdomen；L：足 Leg；W：翅 Wing. 柱上不同小写字母表示 *SexigABP2* 在雌雄虫同一组织的表达量差异显著(t 检验，$P<0.05$)。Different lowercase letters above bars indicate significant difference in expression level of *SexigABP2* in the same tissues of both sexes (t-test, $P<0.05$).

2.4 重组蛋白 pET/SexigABP2 的诱导表达及纯化

将重组质粒 pET/SexigABP2 在大肠杆菌中进行表达。与对照相比，经 IPTG 诱导的菌液和经超声波破碎后的上清，在约 22 kDa 处均有一条明显加粗的蛋白条带(图4：泳道2和3)，而沉淀中的相应位置条带加粗不明显(图4：泳道4)，说明此重组蛋白在大肠杆菌中为可溶性表达。含目的蛋白的上清液经亲和层析柱纯化后，得到纯度较高的目的蛋白(含 His-tag)(图4：泳道5)，为了避免 His-tag 对 SexigABP2 与配体的结合产生影响，该标签用肠激酶进行切除，切除后的目的蛋白再次过亲和层析柱，经 SDS-PAGE 检测后发现，在约 16 kDa 处出现预期的单一蛋白条带(图4：泳道6)。

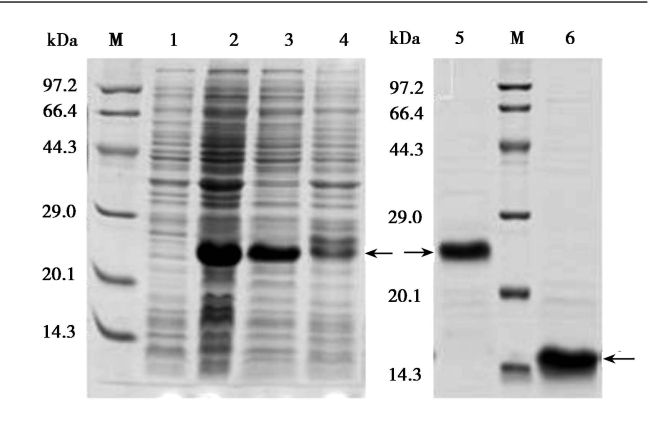


图4　重组蛋白 pET/SexigABP2 的诱导表达及纯化

Fig. 4　The induced expression and purification of recombinant pET/SexigABP2 by SDS-PAGE analysis

M：蛋白分子量标准(Protein molecular weight marker)；1：未经 IPTG 诱导的 pET/SexigABP2 (pET/SexigABP2 before induction with IPTG)；2：经 IPTG 诱导的 pET/SexigABP2 (pET/SexigABP2 after induction with IPTG)；3：pET/SexigABP2 经超声波破碎后的上清(Supernatant of pET/SexigABP2 after sonication)；4：pET/SexigABP2 经超声波破碎后的沉淀(Pellet of pET/SexigABP2 after sonication)；5：纯化后的 pET/SexigABP2 (Recombinant SexigABP2 after purification)；6：肠激酶切除 His 标签后的 SexigABP2 (Purified SexigABP2 with His-tag removed by recombinant enterokinase). 箭头所示位置为目标条带。The target bands are marked by arrows.

2.5 SexigABP2 与不同气味化合物的结合能力

荧光探针 1-NPN 和蛋白的结合曲线见图5(A)，可以看出荧光强度随加入 1-NPN 浓度的提高而增强。根据结合曲线，求得该蛋白与 1-NPN 的结合常数为 7.12 μmol/L。

以 1-NPN 为探针，利用荧光竞争结合实验测定了 35 种不同结构化合物与 SexigABP2 的结合能力(图5：B～H)。结果显示，被测的甜菜夜蛾性信息素及其类似物(14，16 或 18 个碳链长度的乙酸酯、伯醇或醛；含 1～2 个双键)中，醇类组分的结合能力明显高于酯类和醛类组分，其中 *Z*9-14：OH [(*Z*)-9-tetradecenol] 和 *Z*11-16：OH [(*Z*)-11-hexadecenol] 的结合常数分别为 8.24 μmol/L 和 8.57 μmol/L。在乙酸酯类组分中，甜菜夜蛾的性信息素组分 *Z*9，*E*12-14：Ac [(*Z*, *E*)-9, 12-tetradecadienyl acetate] 的结合能力也较强。在被测的常见植物挥发性化合物中，SexigABP2 与短碳链化合物和饱和长碳链化合物的结合能力均较差；但与不饱和长碳链化合物法尼醇和橙花叔醇的结合能力较强，其中与法尼醇的结合常数为 8.14 μmol/L；3 个芳香族类气味物质中，与苯乙酮有一定的结合能力。此外，对不同碳链长度的酯类化合物的测定结果(图5：E)表明，SexigABP2 与长碳链酯类化合物有较强的结合能力。

3 讨论

本研究通过转录组数据分析并结合 RACE 方法，

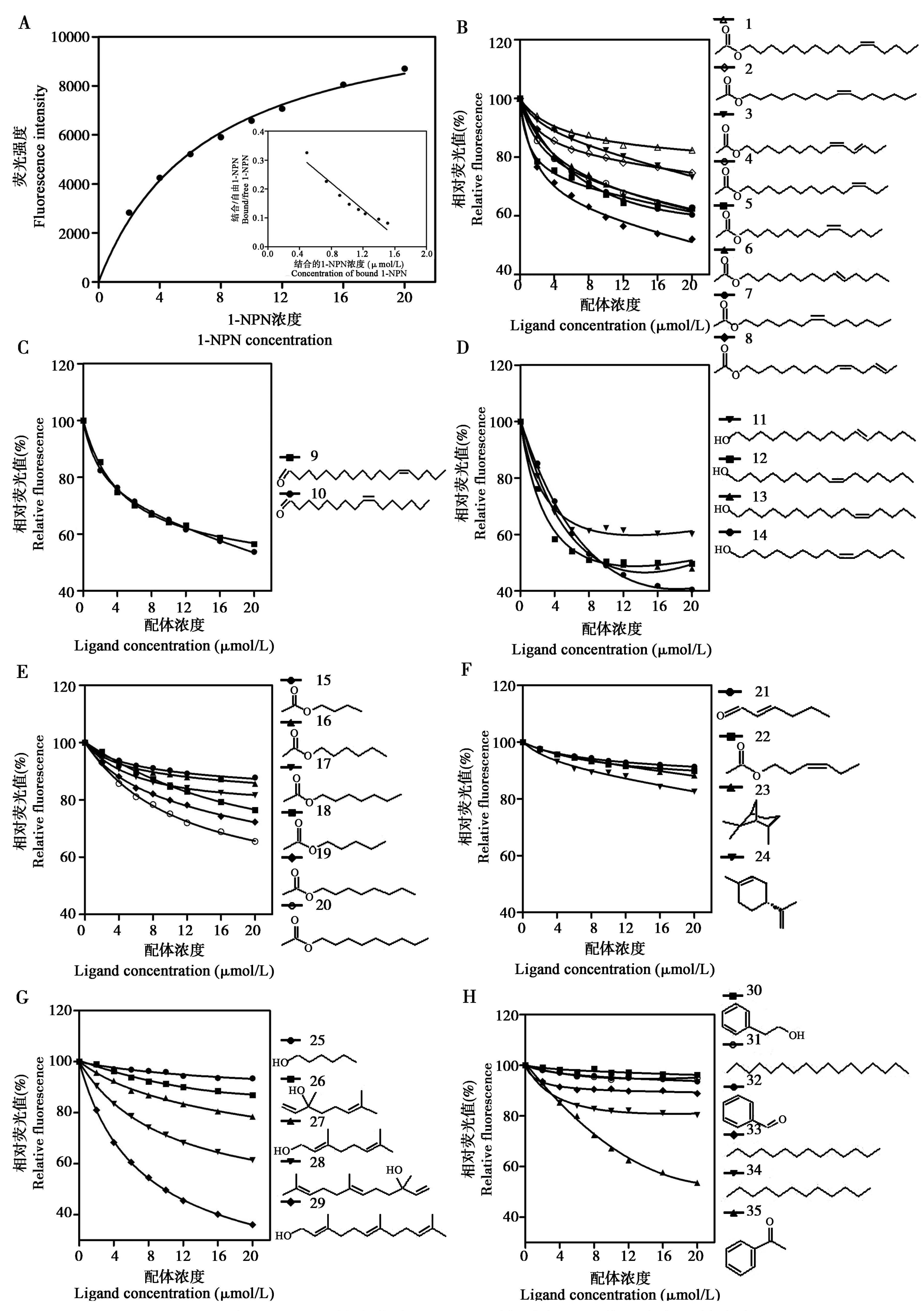


图 5 SexigABP2 与 1-NPN 的结合曲线(A)及不同气味物质的荧光竞争性结合实验(B～H)

Fig. 5 Binding curve of SexigABP2 to 1-NPN (A) and fluorescence competitive binding experiments of SexigABP2 to different odors (B－H)

图例中配体编号同表 2。Ligand no. in the legend is the same as in Table 2.

从甜菜夜蛾触角中克隆了一个触角结合蛋白基因 *SexigABP2* 的全长 cDNA，推导的氨基酸序列具有气味结合蛋白特有的 6 个保守的半胱氨酸位点。该基因的 cDNA 克隆为进一步进行对该蛋白的功能研究及明确昆虫特别是夜蛾科昆虫的嗅觉机制奠定了基础。

组织表达谱分析及雌雄间差异比较是了解基因功能的重要途经。利用 RT-qPCR 技术对 *SexigABP2* 基因的组织表达谱的测定结果表明，该基因在甜菜夜蛾触角中高度表达，并在足、喙和翅中有少量表达，这与很多 OBP 的表达情况类似(Zhang *et al.*, 2011c)。触角是昆虫最重要的嗅觉器官，在寻偶、觅食和选择产卵场所中起主导作用，特别是在夜行性的蛾类昆虫中更是如此；此外，昆虫的足、喙和翅上也分布有一些味觉及嗅觉感器，具有一定的嗅觉功能。因此，*SexigABP2* 在触角中的高表达以及在其他化感组织中的少量表达，暗示其在甜菜夜蛾的嗅觉中起作用。*SexigABP2* 在雌虫触角及足中的表达量分别显著高于雄虫对应组织中的表达量，这与 Zhang 等(2011c)对棉铃虫 *H. armigera ABP1* (*HarmABP1*)的研究结果类似。这一结果说明 *SexigABP2* 可能主要参与对植物挥发性化合物而非性信息素的感受，因为雌蛾需要寻找合适的寄主植物产卵，因而需要更强的对植物挥发性化合物的感受能力；而雄蛾则主要是对雌蛾释放的性信息素进行感受，因而 *SexigABP2* 在雄蛾中的表达量相对较低。

为了进一步探讨 SexigABP2 的功能，我们利用原核表达系统和亲和层析法对其进行了大量表达和纯化，然后测定了 SexigABP2 与包括甜菜夜蛾性信息素组分及其类似物和常见植物挥发性化合在内的 35 种化合物的结合能力。所测配体中，以法尼醇和 3 个醇类性信息素组分(类似物)与 SexigABP2 的结合能力最强。法尼醇为倍半萜类化合物，是多种植物的挥发油组分，其类似物法尼烯是蚜虫的报警信息素(Bowers *et al.*, 1972)。已经证明，豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 的 OBP3 与法尼烯有很好的结合能力，推测其参与了报警信息素的感受(Qiao *et al.*, 2009)。在甜菜夜蛾中，SexigABP2 是否参与对法尼醇及其类似物的感受，用于寻找寄主植物，有待进一步研究证实。另外，进一步扩大寄主植物挥发性化合物的测定范围，有可能筛选到与 SexigABP2 结合能力更强的化合物，并进行深入研究，为防治害虫提供理论基础。在对家蚕 OBPs 功能的研究中发现 BmorABPX 和性信息素组分蚕蛾醇具有较高的结合能力(Zhou *et al.*, 2009)，在本研究中也发现 3 个醇类性信息素组分(类似物)和 SexigABP2 具有较高的结合能力。根据雌雄间表达量的比较结果，我们认为，SexigABP2 可能主要是在对植物挥发性化合物的感受中起作用，而非用于感受性信息素。性信息素类组分的碳链长度、官能团和双键等结构特点可能决定了它们的结合能力(Liu *et al.*, 2012)，这些 14C ~ 16C 的不饱和伯醇中的-OH 可能更易与蛋白结合部位的某些氨基酸形成氢键。另一方面，气味分子被结合蛋白运送到气味受体时，很可能是以“结合蛋白-配体”复合体的形式来激活受体的，因此只有能引起气味结合蛋白特定构象变化的气味分子，才能最终激活受体。在对多音天蚕 *Antheraea polyphemus* PBP1 的研究中发现，虽然 3 种性信息素组分和 ApolPBP1 都有较强的结合能力，但真正能够引起 PBP1 特定构象变化的只有一种(Bette *et al.*, 2002；Mohl *et al.*, 2002)。本研究中 SexigABP2 虽然和醇类信息素组分 *Z*9-14:OH 结合能力较强，但是它们结合以后，是否能够激活受体，尚需研究。

已有研究表明，配体的碳原子数、不饱和键的存在与否与其同气味结合蛋白的结合能力密切相关。Jiang 等(2009)认为东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 OBP1 与 15C 左右的长链化合物的结合能力较强；Zhang 等(2011a)报道正中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 的 OBP4 和 OBP6 对 15C 的萜类化合物的结合能力强于 10C 的萜类化合物；Liu 等(2012)发现斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 PBP1 对含有不饱和键的油酸和亚油酸的结合能力比相应的饱和脂肪族酸类强，并推测化合物中不饱和键能够与 SlitPBP1 的两个高度保守的芳香族氨基酸 Phe12 和 Phe117 的苯环之间产生 π-π 相互作用，从而增强结合能力。本研究也发现，配体的碳链长度及不饱和键的存在与其和 SexigABP2 的结合能力密切相关。甜菜夜蛾的性信息素组分及其类似物均为 14C ~ 18C的长链不饱和化合物，除 3 个乙酸酯组分(*Z*9, *E*11-14: Ac［(*Z*, *E*)-9, 11-tetradecadienyl acetate］、*Z*9-16:Ac［(*Z*)-9-hexadecenyl acetate］和 *Z*11-16:Ac［(*Z*)-11-hexadecenyl acetate］)外，其他配体浓度为 20 μmol/L 时，相对荧光强度均降到 65% 以下。而被测植物挥发性化合物中，结合能力较高的也都是长碳链的不饱和化合物，如法尼醇和橙花叔醇(15C)。相反，SexigABP2 对碳链短的化

合物结合能力很低(如1-己醇、反2-己烯醛、顺3-乙酸己烯酯等);和饱和的长碳链化合物(如正十二烷、正十四烷和正十七烷)的结合能力也很低。此外,配体的官能团种类也影响配体与气味结合蛋白的结合能力,在被测的性信息素组分及其类似物中,醇类组分的结合能力高于乙酸酯类组分。基于以上研究结果,需解析SexigABP2的三维结构和结合位点,进而明确SexigABP2与配体的结合机制。

参考文献(References)

Ban L, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 12(2): 125–134.

Bette S, Breer H, Krieger J, 2002. Probing a pheromone binding protein of the silkmoth *Antheraea polyphemus* by endogenous tryptophan fluorescence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(3): 241–246.

Bowers WS, Nault LR, Webb RE, Dutky SR, 1972. Aphid alarm pheromone: isolation, identification, synthesis. *Science*, 177(4054): 1121–1122.

Burkett-Cadena ND, Mullen GR, 2007. Field comparison of Bermuda-hay infusion to infusions of emergent aquatic vegetation for collecting female mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2): 117–123.

Cilek JE, Ikediobi CO, Hallmon CF, Johnson R, Onyeozili EN, Farah SM, Mazu T, Latinwo LM, Ayuk-Takem L, Berniers UR, 2011. Semi-field evaluation of several novel alkenol analogs of 1-octen-3-ol as attractants to adult *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(3): 256–262.

Hoddle MS, Millar JG, Hoddle CD, Zou Y, McElfresh JS, Lesch SM, 2011. Field optimization of the sex pheromone of *Stenoma catenifer* (Lepidoptera: Elachistidae): evaluation of lure types, trap height, male flight distances, and number of traps needed per avocado orchard for detection. *Bulletin of Entomological Research*, 101(2): 145–152.

Huang CX, Zhu LM, Ni JP, Cao XY, 2002. A method of rearing the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Entomological Knowledge*, 39(3): 229–231. [黄春霞, 朱丽梅, 倪珏萍, 曹晓宇, 2002. 甜菜夜蛾的饲养方法介绍. 昆虫知识, 39(3): 229–231]

Jiang QY, Wang WX, Zhang Z, Zhang L, 2009. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(7): 440–447.

Krieger J, von Nickisch-Rosenegk E, Mameli M, Pelosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3): 297–307.

Liu NY, He P, Dong SL, 2012. Binding properties of pheromone-binding protein 1 from the common cutworm *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(4): 295–302.

Mohl C, Breer H, Krieger J, 2002. Species-specific pheromonal compounds induce distinct conformational changes of pheromone binding protein subtypes from *Antheraea polyphemus*. *Invertebrate Neuroscience*, 4(4): 165–174.

Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z, 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 32(6): 1372–1374, 1376, 1378–1379.

Pelosi P, 1998. Odorant-binding proteins: structural aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855: 281–293.

Qiao H, He X, Schymura D, Ban L, Field L, Dani FR, Michelucci E, Caputo B, Della TA, Iatrou K, Zhou JJ, Krieger J, Pelosi P, 2011. Cooperative interactions between odorant-binding proteins of *Anopheles gambiae*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(10): 1799–1813.

Qiao H, Tuccori E, He X, Gazzano A, Field L, Zhou JJ, Pelosi P, 2009. Discrimination of alarm pheromone (*E*)-β-farnesene by aphid odorant-binding proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5–6): 414–419.

Simon P, 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 19(11): 1439–1440.

Sun HY, Yin J, Feng HL, Li KB, Xi JH, Cao YZ, 2011. Expression, purification and binding characteristics of general odorant binding protein Ⅰ (GOBP1) from the meadow moth *Loxostege sticticalia* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralididae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(4): 381–389. [孙红岩, 尹姣, 冯红林, 李克斌, 席景会, 曹雅忠, 2011. 草地螟普通气味结合蛋白 Ⅰ (Lsti-GOBP1)蛋白表达纯化及结合特性分析. 昆虫学报, 54(4): 381–389]

Vogel H, Heidel AJ, Heckel DG, Groot AT, 2010. Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *BMC Genomics*, 11(1): 29–49.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 24(5): 481–495.

Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR, 1991. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *Journal of Neurobiology*, 22(1): 74–84.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5827): 161–163.

Xia XM, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ, 2003. Resistance situation of the *Spodoptera exigua* (Hübner) and its synthetic control. *Pesticides*, 42(8): 1–5. [夏晓明, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2003. 甜菜夜蛾抗药性现状及综合治理研究进展. 农药, 42(8): 1–5]

Xiu WM, Dong SL, Miao H, Mu LF, 2005. Molecular cloning and sequence analysis of two cDNA fragments of pheromone binding protein in male beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Scientia Agricultura Sinica*, 38(7): 1501–1504. [修伟明, 董双林, 苗慧, 穆兰芳, 2005. 2个甜菜夜蛾信息素结合蛋白cDNA

片段的克隆和序列分析. 中国农业科学, 38(7): 1501 – 1504]

Zhang S, Chen LZ, Gu SH, Cui JJ, Gao XW, Zhang YJ, Guo YY, 2011a. Binding characterization of recombinant odorant-binding proteins from the parasitic wasp, *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Chemical Ecology*, 37 (2): 189 – 194.

Zhang T, Feng J, Cai C, Zhang X, 2011b. Synthesis and field test of three candidates for soybean pod borer's sex pheromone. *Natural Product Communications*, 6(9): 1323 – 1326.

Zhang TT, Gu SH, Wu KM, Zhang YJ, Guo YY, 2011c. Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of male and female cotton bollworms *Helicoverpa armigera* (Hübner) and expression analysis of putative odorant-binding protein genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(2): 393 – 399.

Zhou JJ, Robertson G, He X, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *Journal of Molecular Biology*, 389(3): 529 – 545.

Zhou JJ, Zhang GA, Huang W, Birkett MA, Field LM, Pickett JA, Pelosi P, 2004. Revisiting the odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*: evidence for odour recognition and discrimination. *FEBS Letters*, 558(1 – 3): 23 – 26.

(责任编辑：赵利辉)